



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Identificación de los serogrupos de *Leptospira* spp. en
alpacas del IVITA Maranganí**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Yaquelyn BETTER BACA

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Better Y. Identificación de los serogrupos de *Leptospira* spp. en alpacas del IVITA Maranganí [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día miércoles 21 de diciembre de 2016 a las 10:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 148-EPMV/FMV-2016, integrado por los siguientes profesores:

ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY	Presidente del Jurado
SONIA CALLE ESPINOZA	Asesora de la Tesis
MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ	Miembro del Jurado
ALEXEI SANTIANI ACOSTA	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: BETTER BACA. YAQUELYN, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROGRUPOS DE *Leptospira* spp. EN
ALPACAS DEL IVITA MARANGANI”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su APROBACIÓN por UNANIMIDAD, otorgándole la nota de DIESISIETE (17)

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 11:00 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Armando González Zariquiey: PhD. Prof. Principal, T.C.

Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal, D.E.

Mercy Ramírez Velásquez: Mg. Prof. Auxiliar, D.E.

Alexei Santiani Acosta: Dr. Prof. Asociado, T.P.





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 148-EPMV/FMV-2016


PRESIDENTE :


ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY

MIEMBROS :


SONIA CALLE ESPINOZA
Asesora de la Tesis


MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ


ALEXEI SANTIANI ACOSTA

San Borja, 21 de diciembre de 2016

V° B°


Dra. DAPHNE RAMOS DELGADO
Directora de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria



Dedicada a:

A mis seres amados por su apoyo
incondicional en cada paso logrado, por
ser mi soporte en cada caída, por creer
siempre en mí

A la Universidad Nacional Mayor de San
Marcos por todo el aprendizaje
compartido, por tantas experiencias y
exigencias académicas, por ser como un
hogar

A cada uno de ustedes que sigue sus
sueños a pesar de los obstáculos y las
propias excusas

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme hoy escribir estas palabras

A mi asesora de tesis por depositar su confianza en mí y brindarme la oportunidad de desarrollar mi primer proyecto de investigación.

A cada miembro de la familia del laboratorio de Bacteriología, por compartir su amistad, conocimientos, experiencias y esfuerzo. Por el apoyo y el empuje que inspiran.

A cada docente que de una u otra manera formó parte en la maduración de la tesis, por guiarme mediante sus enseñanzas, conceptos, críticas y puntos de vista.

Al personal del IVITA Marangán, en especial al MVZ Danilo Peso, por la colaboración y planificación del muestreo.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE CUADROS	xii
I. INTRODUCCIÓN	13
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Aspectos históricos	15
2.2. Taxonomía y clasificación	16
2.2.1. Taxonomía	16
2.2.2. Clasificación serológica	16
2.2.3. Clasificación genotípica	17
2.3. Biología de las leptospiras	17
2.3.1. Biología general	17
2.3.2. Factores de virulencia	19
2.3.3. Cultivo	20
2.3.3.1. Requerimientos nutricionales	20
2.3.3.2. Medios de cultivos	20
2.4. Epidemiología	21
2.4.1. Hospederos	21
2.4.2. Medio ambiente	22
2.4.3. Factor de riesgo	23

2.4.4. Prevalencia en alpacas	23
2.5. Patogenia	24
2.6. Manifestaciones clínicas.....	26
2.6.1. Manifestaciones clínicas en camélidos	27
2.7. Diagnóstico.....	28
2.7.1. Toma de muestra.....	28
2.7.2. Examen directo	29
2.7.2.1. Microscopia directa	29
2.7.2.2. Cultivo.....	30
2.7.3. Diagnóstico molecular	31
2.7.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	31
2.7.4. Examen indirecto	32
2.7.4.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).....	32
2.7.4.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas IgM	34
2.8. Inmunidad.....	34
2.8.1. Respuesta inmune	34
2.8.2. Vacunas.....	35
2.8.2.1. Vacunación en alpacas	36
2.9. Tratamiento.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Lugar de estudio	38
3.2. Tamaño de muestra.....	38
3.2.1. Toma de Muestra	39
3.3. Evaluación serológica de las muestras	39
3.3.1. Elección de serovares para la Prueba de Microaglutinación	39

3.3.2. Preparación del antígeno.....	39
3.3.3. Evaluación del antígeno.....	40
3.3.4. Evaluación serológica o tamizaje	40
3.3.5. Evaluación serológica cuantitativa o final	41
3.3.6. Lectura del MAT	42
3.4. Análisis estadístico	43
IV. RESULTADOS.....	44
4.1. Seropositividad de las muestras.....	44
4.2. Seropositividad a serogrupos patógenos	44
4.3. Títulos de aglutinación a serogrupos patógenos.....	45
4.4. Coaglutinaciones	46
V. DISCUSIÓN.....	47
VI. CONCLUSIONES	51
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	52
VIII. APÉNDICE	62

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana de distribución mundial. Es causado por espiroquetas del género *Leptospira*, clasificadas serológicamente en 25 serogrupos patógenos. En las alpacas, la infección ha sido asociada a abortos y problemas reproductivos, sugiriendo un rol potencial como hospedero en la epidemiología de la leptospirosis de las zonas altoandinas. Por ello, el objetivo del estudio fue identificar los serogrupos de *Leptospira* spp. presentes en las alpacas del IVITA Maranganí. Se muestreó 126 alpacas mayores a 1 año de edad en la Raya-Cusco. Los sueros obtenidos fueron evaluados mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) en la Sección Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se utilizaron serovares de referencia internacional de 21 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. Se determinó que el 42.85%, con una distribución entre 34.51 y 51.7, de las alpacas fueron seropositivas 9 serogrupos patógenos: Icterohaemorrhagiae 12.69 % (7.97-19.62), Pomona 11.11% (6.77-17.81), Panama 11.11% (6.77-17.81), Hurtsbridge 9.52% (4.21-12.23), Ranarum 5.55% (2.76-11.03), Ballum 1.58% (0.48-5.54), Cynopteri 1.58% (0.48-5.54), Djasiman (0.19-4.3), Hebdomadis 0.79% (0.19-4.3) y sólo el 2.38% (3/126) presentó coaglutinaciones. El análisis de los intervalos de confianza, obtenidos por simulación, indicó diferencia estadística significativa entre las frecuencias de los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona y Panama y los serogrupos Ballum, Cynopteri, Hebdomadis y Djasiman. El estudio concluye en la identificación de 5 serogrupos no reportados en alpacas: Ballum, Djasiman, Hurtsbridge, Panama y Ranarum.

Palabras clave: *Leptospira*, serogrupos, Microaglutinación, alpacas

ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial zoonotic disease of worldwide distribution. It is caused by spirochetes of the *Leptospira* genus, serologically classified in 25 pathogenic serogroups. In alpacas, the infection has been associated with abortions and reproductive problems, suggesting a potential role as a host in the epidemiology of leptospirosis in the high-Andean areas. The objective of the study was to identify serogroups of *Leptospira* spp. in alpacas from IVITA Maranganí. A number of 126 alpacas older than 1 year old, from La Raya-Cusco, were sampled. The serum samples obtained were transported to the bacteriological section of the Laboratory of Microbiology and Parasitology, Department of Veterinary Medicine from the National Major University of San Marcos, where they were evaluated with the Microscopic Agglutination Test (MAT), using international reference serovars of 21 pathogenic serogroups of *Leptospira* spp. The results estimated that 42.85% of alpacas (54/126), from a distribution between 34.51 y 51.7, were seropositive to 9 pathogenic serogroups: Icterohaemorrhagiae 12.69 % (7.97-19.62), Pomona 11.11% (6.77-17.81), Panama 11.11% (6.77-17.81), Hurtsbridge 9.52% (4.21-12.23), Ranarum 5.55% (2.76-11.03), Ballum 1.58% (0.48-5.54), Cynopteri 1.58% (0.48-5.54), Djasiman (0.19-4.3) and Hebdomadis 0.79% (0.19-4.3), and only 2.38% presented coagglutination. Analyses of confidence intervals, obtained by simulation, showed significative statistic differences between the serogroups frequency of Icterohaemorrhagiae, Pomona and Panama and Ballum serogroups, Cynopteri, Hebdomadis and Djasiman. As a final result, the study achieved to identify 5 serogroups without antecedents in alpacas: Ballum, Djasiman, Hurtsbridge, Panama and Ranarum.

Key words: *Leptospira*, serogroups, Microscopic Agglutination, alpacas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Microscopía electrónica de <i>L. Interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA	18
Figura 2.	Ciclo de infección <i>Leptospira</i> spp.	22
Figura 3.	Fases y cinética de la leptospirosis	29
Figura 4.	Diagrama del procesamiento del MAT	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Frecuencia de serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. en alpacas (n=155)	45
Cuadro 2.	Títulos de anticuerpos contra serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. de las alpacas seropositivas (n=57)	45
Cuadro 3.	Serogrupos y título de anticuerpos coaglutinantes	46

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica bacteriana de distribución mundial que afecta a los mamíferos, principalmente a aquellos que habitan regiones con climas tropicales y subtropicales. Sin embargo, en las áreas altoandinas donde las condiciones medioambientales son desfavorables para la supervivencia de las especies de *Leptospira* spp., se ha determinado que existe alta prevalencia de leptospirosis en los camélidos sudamericanos. La infección en las llamas y alpacas, al igual que en el ganado bovino, ha sido asociada a cuadros de abortos y nacimiento de crías débiles. Hechos que influyen negativamente en la crianza y producción de alpacas, considerada una actividad económica importante para el poblador altoandino que deriva ganancias del comercio de la fibra y carne (Rosadio *et al.*, 2003).

Las leptospiras ingresan al organismo a través de las membranas mucosas por contacto con la orina, agua y alimentos contaminados. A partir de día 10°-14° de la infección, se incrementa el nivel de anticuerpos aglutinantes que reaccionan contra los antígenos vivos de los serovares utilizados en la prueba de Microaglutinación (MAT). Esta prueba es considerada la prueba de referencia internacional para el diagnóstico de leptospirosis humana y animal (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Las leptospirosis pueden ser patógenas, intermedias o saprófitas y vivir en animales o libres en el medio ambiente. Conocer los serogrupos a los que se expuso una especie animal sugiere el rol potencial del animal en el mantenimiento y diseminación de las leptospirosis. En este sentido, es importante elegir cuidadosamente el panel de antígenos para la prueba de Microaglutinación. La adecuada selección incrementa la sensibilidad de la prueba y disminuye los costos de su realización (Picardeau, 2013). El objetivo del presente estudio fue identificar los serogrupos de *Leptospira* spp., en alpacas del IVITA Marangani, para lo cual se utilizó serovares representativos de 21 serogrupos patógenos en la prueba de Microaglutinación

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos históricos

El MINSA (2000) describe la historia de la leptospirosis. La revisión señala que a inicios del siglo XIX Lacereaux hizo la primera descripción de un caso clínico compatible con leptospirosis. En 1883, Landarouzi describió un caso típico de ictericia y hemorragia al que denominó tifus hepático y en 1886, Adolf Weil describió en Heidelberg-Alemania cuadros agudos de fiebre, ictericia y daño renal severo. Asimismo en 1887, el síndrome fue nombrado como enfermedad de Weil por Goldschmidt. Actualmente, leptospirosis es conocida como enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales o fiebre de los cañaverales (Acha y Szyfres, 1986).

En su revisión sobre Leptospirosis, Levett (2001) señala que en 1907, Stimson visualizó conglomerados de espiroquetas semejantes a un signo de interrogación en la evaluación histológica de un riñón de un paciente fallecido por Fiebre Amarilla, denominándolo *Spirochaeta interrogans*. En 1914, los japoneses Inada e Ido hallaron espiroquetas y fenómenos hemorrágicos en el hígado de cobayos infectados experimentalmente con sangre de mineros que presentaron fiebre intensa por lo que la denominaron *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*. Un año después, en 1915, lograron aislar el agente causal. Finalmente, Cerqueira y Picardeau (2009), describe que Wolbach y Binger proporcionaron la primera descripción válida de las leptospiras saprófitas y ya después de un estudio sobre

aislamientos realizados en Japón, Europa y EEUU, Noguchi propuso el nombre del género *Leptospira*.

2.2. Taxonomía y clasificación

2.2.1. Taxonomía

El término *Leptospira* proviene del griego *leptos* y el latín *spira* que significan delgado y enrollado respectivamente (Levett y Haake, 2009). Las leptospiras son bacterias que se ubican en el orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y género *Leptospira* (Faine *et al.*, 1999).

Antes de 1989, el género *Leptospira* fue dividido en dos especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* que comprendían cepas patógenas y cepas saprófitas, respectivamente. Ambas especies se diferencian fenotípicamente por sus exigencias en el cultivo. El crecimiento a 13°C en presencia de 8-azaguanina y la conversión a formas esféricas en 1M NaCl sugieren que las leptospiras son saprófitas (Johnson y Rogers, 1964a). Por el contrario, las cepas patógenas no crecen a bajas temperaturas y exhiben un tiempo de generación de 20 h. Las especies saprófitas crecen más rápido con un promedio de generación de 5 h (Cerqueira y Picardeau, 2009).

2.2.2. Clasificación serológica

Por debajo del taxón de especie, el serovar es considerado la unidad sistemática básica de las especies de *Leptospira* spp. La clasificación en serovares se basa en la prueba serológica de Aglutinación-absorción cruzada (CAAT) (Kmety y Dikken, 1993). Dos cepas aisladas pertenecen a diferentes serovares si después de la absorción cruzada con cantidades adecuadas de antígenos heterólogos, al menos 10% del título homólogo permanece asociado con uno de los dos antisueros en pruebas repetidas (OMS, 2008)

Los serovares homólogos antigénicamente han sido clasificados en serogrupos. El serogrupo carece de valor taxonómico pero ha demostrado ser útil para el diagnóstico

serológico y la comprensión epidemiológica a nivel regional o poblacional (Levett, 2015). Actualmente, todas las especies de leptospiras se clasifican en 25 serogrupos patógenos, un serogrupo saprófito y aproximadamente 250 serovares de acuerdo a la expresión de los lipopolisacáridos (LPS) expuestos en la superficie (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010).

2.2.3. Clasificación genotípica

La demostración de la heterogeneidad genética mediante la prueba de Hibridación del ADN originó la sustitución de la clasificación fenotípica y la definición 20 especies genómicas o genomoespecies (Brendle *et al.*, 1974). Entre la clasificación genotípica y serológica no existe correlación. En un serogrupo pueden coexistir varias especies de *Leptospira* spp. Asimismo, algunas especies pueden contener serovares patógenas y no patógenas (Brenner *et al.*, 1999).

Actualmente, las especies de *Leptospira* spp. han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a su filogenésis y patogenicidad. Existe especies saprófitas (cepas ambientales), especies patógenas (cepas aisladas de humanos y animales) y especies intermedias distintas a las patógenas y saprófitas de acuerdo a la secuencia del gen 16S ARNr. La virulencia no ha sido demostrada experimentalmente en las especies intermedias (Apéndice A 1) (Picardeau, 2013).

2.3. Biología de las leptospiras

2.3.1. Biología general

Las leptospiras son bacterias gram negativas de forma helicoidal (espiroquetas) y con ambos extremos doblados en forma de gancho. Se caracterizan por ser flexibles, largas y delgadas (Levett, 2001). Miden aproximadamente 0,1 μm de ancho por 6-20 μm de largo, su amplitud helicoidal oscila entre 0,1-0,15 μm , y la longitud de onda es de aproximadamente 0,5 μm (Faine *et al* 1999).

Las leptospiras exhiben movimientos flexibles de rotación y traslación debido a dos filamentos axiales (flagelos periplasmáticos) que se localizan en el espacio periplasmático y se insertan en cada uno de los dos extremos polares (Faine *et al* 1999). En la membrana externa, el LPS constituye el principal antígeno estructural altamente inmunogénico; sin embargo, es relativamente no tóxico, 12 veces menos letal para los ratones en comparación con LPS de la especie *E. coli* (Palaniappan *et al.*, 2007).

Las especies patógenas aisladas son comúnmente más cortas y enrolladas que las cepas saprófitas y las cepas sometidas a pasajes seriados en el laboratorio. Estas últimas pueden ser extremadamente alargadas e incluso formar cuerpos esféricos que a menudo se correlacionan con la pérdida de la motilidad y la disminución de la salud celular (Cameron, 2015).

El genoma de las especies de *Leptospira* spp. está compuesto de un cromosoma de 4 400 kb y otro pequeño de 350 kb. Un tercer cromosoma denominado p74 fue identificado en la especie *L. biflexa* y ha sido asociado a la supervivencia y viabilidad de las especies saprófitas. No obstante, 13 genes de homeostasis de p74 se han identificado en el cromosoma I de las cepas patógenas (Zuener, 1991; Picardeau *et al.*, 2008).

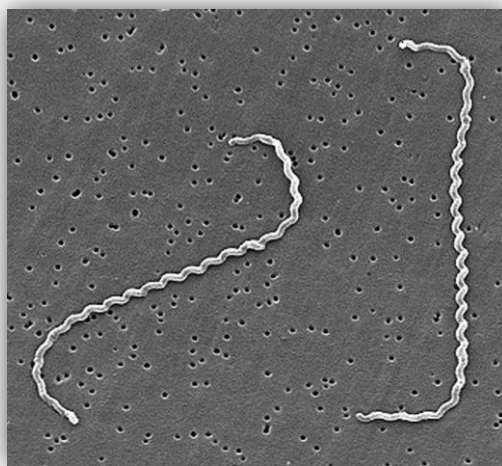


Figura 1. Microscopía electrónica de *L. Interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA (Levett, 2001)

2.3.2. Factores de virulencia

El mecanismo por el cual las leptospiras atraviesan las capas celulares de la piel lesionada y las membranas mucosas aún se desconoce. No obstante, propiedades como la quimiotaxis y la motilidad favorecerían la entrada al hospedero (Levett, 2001). Las leptospiras patógenas poseen alrededor de 12 proteínas quimiotácticas aceptadoras de metil (MCPs) que les permite responder a estímulos como a la hemoglobina, lo cual sugiere quimiotaxis hacia el área lesionada (Nascimento *et al.*, 2004).

En la invasión, las leptospiras emplean enzimas transportadas a la superficie bacteriana como las fosfolipasas o esfingomielinasas. Éstas proporcionan ácidos grasos de cadena larga por β -oxidación de las membranas celulares ocasionando daño celular y hemólisis (Narayanavari *et al.*, 2012). Otro factor de virulencia clave para la supervivencia en el medio es la adquisición de hierro por acción de las hemolisinas tlyABC a partir del grupo Hemo y la hemoglobina. Alrededor de 12 receptores dependientes de TonB estarían involucrados en la importación del grupo Hemo y otras moléculas con hierro (Nascimento *et al.*, 2004). Las hemolisinas también lesionarían el endotelio de los pequeños vasos sanguíneos, generando hemorragia e isquemia (Picardeau, 2009).

Las leptospiras sintetizan proteasa, collagenasa, metaloproteasa, hialuronidasa y termolisinas. Estas enzimas degradan la matriz extracelular de los tejidos favoreciendo la adhesión a componentes como el ácido hialurónico, glucosaminoglucanos, fibras de colágeno, laminina, fibronectina a través de Proteínas de Unión (García, 2013). No obstante, ninguna proteína ha mostrado ser un factor de virulencia esencial e indispensable, lo cual está asociado a la redundancia funcional de las proteínas de *Leptospira* (Murray *et al.*, 2013).

Las proteínas de Unión son componentes de la superficie microbial que reconocen la matriz extracelular. Las proteínas de unión a la fibronectina (Lsa 66) permiten la adhesión a los vasos sanguíneos, promueven la unión de los polimorfos, fagocitos mononucleares y las células natural killer e incrementa la fagocitosis en ausencia de opsoninas específicas (Cinco *et al.*, 2002). Las proteínas de unión a la laminina y el endotelio (Len) permitirían

atravesar las capas tisulares (Stevenson *et al.*, 2007). Las proteínas de unión a la elastina (LigB, Omp37, Omp47) participarían en la colonización de la piel y la hemorragia del endotelio vascular de los pulmones y el aborto (Lin *et al.*, 2009). Un estudio develó que LigB inhibiría la reparación tisular y la formación de fibras. Las proteínas de unión al fibrinógeno (LigB, Lsa33, OmpL1) inhiben parcialmente la formación de fibrina y finalmente las proteínas de unión al plasminógeno (LenA y Lip32) activarían la proenzima en presencia del plasminógeno uroquinasa, lo cual degradaría los componentes de la matriz extracelular (Lähteenmäki *et al.*, 2001).

2.3.3. Cultivo

2.3.3.1. Requerimientos nutricionales

Las leptospiros se caracterizan por su relativa inercia metabólica en pruebas fenotípicas. Los marcadores fisiológicos indican que son bacterias aeróbicas, catalasa y oxidasa positivas (Levett y Haake, 2009). Crecen a una temperatura aproximada de 28-30°C, pH óptimo de 7.2-7.4 y pierden rápidamente su motilidad en medios ácidos (Smibert, 1977).

Los medios de cultivo están enriquecidos principalmente con factores de crecimiento como las vitaminas B2 y B12, hierro. Sales de amonio como fuentes de nitrógeno y ácidos grasos de cadena larga como fuentes de carbono. Algunas cepas más exigentes requieren la adición de piruvato o suero de conejo para el aislamiento inicial (Faine *et al.*, 1999). El crecimiento de los contaminantes puede ser inhibido por la adición de 5-fluorouracilo y antibióticos tales como la gentamicina, ácido nalidíxico o rifampicina. Sin embargo, el uso de agentes selectivos puede reducir las posibilidades del aislamiento cuando sólo haya un número pequeño de leptospiros viables (Johnson y Rogers, 1964b; Faine *et al.*, 1999).

2.3.3.2. Medios de cultivos

Actualmente, el medio más utilizado es el medio líquido EMJH (Ellinghausen McCullough Johnson Harris). Contiene principalmente ácido oleico (Tween 80) y albumina (Ellinghausen y McCullough, 1965). La hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del

Tween 80 produce ácidos grasos libres, citotóxicos aún a concentraciones subóptimas. La albumina actúa como agente detoxificante y estabilizador al unirse a 4-6 moléculas de ácidos grasos libres a través de 3 clases diferentes de sitios de unión. Esta unión constituye una reserva de ácidos grasos que repone aquellos utilizados (González *et al.*, 2002).

2.4. Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial. Un problema de salud pública principalmente en los países en desarrollo (Bharti *et al.*, 2003). Las zonas endémicas incluyen las islas del Caribe, América Central y América del Sur, el Sudeste de Asia y las islas del Pacífico. En los países desarrollados, se considera una enfermedad emergente asociada a actividades laborales y recreativas (Ricaldi y Vinetz, 2006).

2.4.1. Hospederos

Varias especies mamíferas desempeñan el rol de hospederos. Los hospederos incidentales son aquellos que desarrollan la enfermedad aguda. Mientras que, el hospedero de mantenimiento o también llamado reservorio se define como la especie mamífera que mantiene una infección crónica, endémica de la región en forma asintomática o con manifestaciones leves (Céspedes, 2005).

En los reservorios, la transmisión se realiza vía transplacentaria o durante el periodo neonatal. Las leptospiras se alojan y multiplican en los túbulos renales y se eliminan a través de la orina de manera intermitente o continua. La concentración urinaria puede ser tan alta como 10^8 leptospiras/ml. Las leptospiras no sobreviven en la orina ácida. En consecuencia, los herbívoros y animales cuya dieta produce orina alcalina son relativamente más importantes como excretores que los productores de orina ácida (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

El conocimiento de los serogrupos prevalentes y sus reservorios es esencial para la comprensión de la epidemiología en cualquier región. El portador renal es un componente fundamental para la persistencia de la leptospirosis (Levett, 2001). Los reservorios más

importantes son los roedores. Las ratas son generalmente reservorios de los serogrupos Ballum e Icterohaemorrhagiae mientras que los ratones del serogrupo Ballum. Existen asociaciones entre algunas especies domésticas y determinados serovares. Sin embargo, éstas no son absolutas. Por ejemplo los cerdos albergan a los serogrupos Pomona, Tarassovi y Bratislava; las ovejas, a los serogrupos Hardjo y Pomona; los perros; al serogrupo Canicola; y el ganado vacuno; al serogrupo Grippityphosa, Pomona y Hardjo (Hartskeerl y Terpstra, 1996). La infección en gatos es rara. (Levett, 2001).

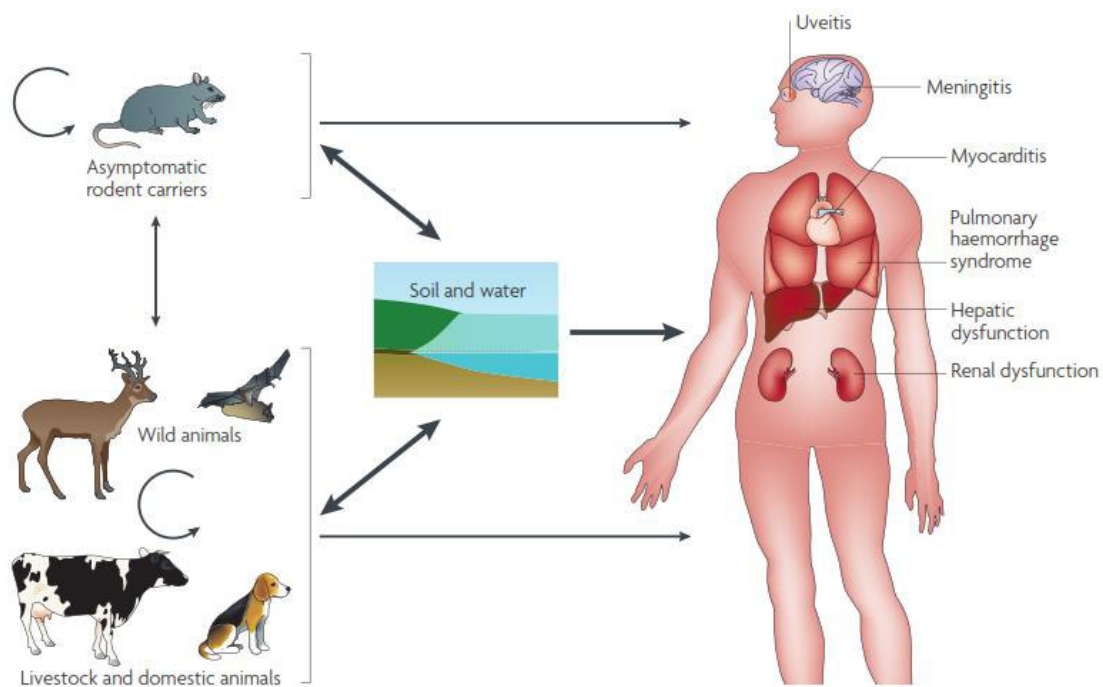


Figura 2. Ciclo de infección *Leptospira* spp. (Ko *et al.*, 2009)

2.4.2. Medio ambiente

Las leptospirosis es una enfermedad endémica, principalmente de regiones con climas tropicales y subtropicales. La incidencia es estacional sobre todo en épocas de lluvias e inundaciones (Everard y Everard, 1993; Ratnam, 1994). La supervivencia de los diversos serovares depende de las condiciones ecológicas de la región, humedad, temperatura, el pH

(7.2-8), la disponibilidad de nutrientes y la presencia de otros microorganismos en la composición de los suelos (Hellstrom y Marshall, 1978).

Las leptospiiras patógenas no se replican fuera del huésped. Se inactivan fácilmente en el medio cuando están expuestos a condiciones de salinidad, desecación, radiación ultravioleta, desinfectantes y temperaturas de congelamiento (Levett, 2001; Sykes, 2013). Por otra parte, ensayos en placa de poliestireno han demostrado que las leptospiiras son capaces de agregarse para formar biofilms o biopelículas que contribuirían a la supervivencia de las leptospiiras saprofitas (Evangelista y Corburn, 2010).

2.4.3. Factor de riesgo

Las infecciones humanas pueden ser adquiridas en actividades laborales, recreativas y exposiciones involuntarias. El trabajo es considerado un factor de riesgo asociado a personas cuya actividad laboral está en contacto directo con la orina de animales infectados como es el caso de los alpaqueros, ganaderos, veterinarios, trabajadores de mataderos, inspectores de carne, etc (Waitkins, 1986).

La infección en los ganaderos está relacionada a la mastitis bovina, la presencia del serovar Hardjo y el ordeñamiento. El serovar Hardjo infecta al ganado vacuno en todo el mundo y produce brotes de mastitis y abortos. Se ha aislado de fetos abortados y sanos, terneros prematuros, descargas vaginales, el tracto genital, urinario y en semen de toros (Ellis *et al.*, 1985b).

2.4.4. Prevalencia en alpacas

La epidemiología de la infección en los animales domésticos en las zonas altoandinas se encuentra pobremente esclarecida. Al respecto, Herrera *et al.* (2000) señaló que la leptospirosis en las alpacas tiene una etiología multifactorial. Las lluvias funcionarían como un factor condicionante y la presencia de otras especies en el hábitat de los camélidos podría contribuir al mantenimiento de la enfermedad durante todo el año (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989).

En Argentina, Brihuega *et al.*, (1996) reportaron la presencia de los serovares Pomona, Grippotyphosa y Patoc en llamas, guanacos y vicuñas de la provincia de Buenos Aires. Así mismo, Llorente *et al.*, (2002) halló anticuerpos contra *Leptospira* spp, principalmente para los serovares Copenhageni y Castellonis en llamas, guanacos y vicuñas de distintas provincias de Argentina.

En el altiplano puneño, Herrera *et al.*, (2000) halló 6.5% (n=810) de prevalencia a siete serovares y mayor frecuencia del serovar Pomona 79.2%. En alpacas de zonas colindantes y perteneciente a la provincia de Canchis Cusco se detectó mayor prevalencia para los serovares Pomona (49%), Icterohemorrhagiae (47%) y Canicola (19%) (Rosadio *et al.*, 2003).

En una investigación realizada en 208 vicuñas silvestres y en cautiverio, 574 alpacas y 43 llamas de las comunidades campesinas de Salinas y Aguada Blanca (Arequipa), se halló bajos títulos para los serovares Copenhageni (3.4%), Pomona (1.4%) y Autumnalis (1%) en las vicuñas mientras que, las alpacas y llamas mostraron títulos altos a los serovares Pomona (19.4%) y Autunmalis (13.8%) (Ortega *et al.*, 2009).

La prevalencia en la sierra central del Perú se evaluó en los departamentos de Huancavelica y Ayacucho, donde se señaló que el 89.6% (n=711) de las alpacas reaccionaron positivamente a cuatro serovares patógenos; especialmente a los serovares Icterohemorrhagiae (43.4%) y Pomona (37.8%). Asimismo, el 77.4% (n=151) de las vicuñas reaccionaron a los serovares Icterohaemorrhagiae (69.2%) y Pomona (8.2%) (Rosadio *et al.*, 2012)

2.5. Patogenia

La infección es resultado de la exposición directa a orina y tejidos infectados de reservorios o al contacto indirecto con agua, suelos y alimentos contaminados. Las leptospiros ingresan al organismo a través de abrasiones en la piel, membranas mucosas (ocular, nasal u oral) e incluso mediante piel intacta reblandecida por la prolongada

inmersión en el agua (Ko *et al.*, 2009; Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). La transmisión también puede ocurrir durante el apareamiento y de forma transplacentaria. (Mesa, 2010; Ellis, 2015).

Las leptospiras migran en el organismo a través del sistema linfático y circulatorio. Se disemina a todo el organismo, principalmente al hígado y riñón. También al corazón, músculos esqueléticos e incluso el sistema nervioso central y el humor acuoso. El periodo de incubación es de aproximadamente 12 días con un rango de 2-30 días (Céspedes, 2005).

La primera etapa de la enfermedad clínica aguda es la fase septicémica. Se caracteriza por la migración de bacterias, enzimas o productos antigénicos de la lisis bacteriana ocasionando el incremento de la permeabilidad vascular, la lesión endotelial y una eventual hipoxemia derivada del daño vascular (Silva *et al.*, 2008). La gravedad clínica a menudo parece estar fuera de proporción con los hallazgos histopatológicos, lo que sugiere la presencia de productos tóxicos liberados por la bacteria (Levett, 2001).

La segunda etapa es la fase inmune. La desaparición de las leptospiras del torrente sanguíneo coincide con la aparición de anticuerpos a niveles detectables en la sangre 10-14 días después de la infección. Alcanzan niveles máximos a las 3-6 semanas. Un período de bacteriemia secundaria (después de 15-26 días) rara vez se ha reportado (Levett, 2001; Ellis, 2015).

Transcurridos 14-28 días desde el inicio de los signos clínicos, las bacterias se localizan en los túbulos renales proximales donde se multiplican y se eliminan por la orina durante semanas o meses (Acosta *et al.*, 1994). La duración e intensidad de la bacteriuria varía con la especie de *Leptospira*, el animal afectado y el serovar infectante (INS, 2002).

Las leptospiras son resistentes a la actividad bactericida del suero y de los polimorfonucleares. No obstante, son fagocitadas por macrófagos solo en presencia de anticuerpos específicos y complemento lo que sugiere que la envoltura exterior de las leptospiras posee un componente antifagocítico (Vinh *et al.*, 1982). Por otro lado, la

intensidad de la respuesta inmune también está implicada en la patogénesis por la formación de inmunocomplejos, liberación de citoquinas y la generación de vasculitis autoinmune. La producción de complejos inmunes puede conducir al compromiso pulmonar, renal, hepático, la inflamación del sistema nervioso central y el desarrollo de meningitis (Céspedes, 2005). La mejoría clínica se correlaciona con la caída de los niveles circulantes de complejos inmunes (Levett, 2001).

A nivel del tracto reproductivo, las leptospiras se pueden localizar en el útero. La infección transplacentaria se produciría durante un limitado período de leptospiremia materna por disminución de la inmunidad uterina (Ellis, 2015). El cambio hormonal continuo en el tracto reproductivo de la hembra también favorecería la multiplicación de las leptospiras (Mesa, 2010).

La leptospirosis produce vasculitis generalizada que conlleva al retraso del crecimiento placentario y al compromiso multiorgánico fetal (MSAL, 2014). La placenta puede encontrarse edematosa, pero los cambios inflamatorios no son severos. La expulsión del feto autolizado usualmente se produce luego de la muerte fetal (Mesa, 2010). Si la competencia inmune se ha desarrollado, los anticuerpos se pueden encontrar en los fetos de cerdos, ganado vacuno y caballos (Ellis, 2015). En los machos las leptospiras puede permanecer en los testículos y vesículas seminales por periodos extendidos sin causar efectos patológicos (Mesa, 2010).

La patogenia de la uveítis recurrente equina parece implicar la producción de anticuerpos contra un antígeno de *Leptospira* que reaccionan de forma cruzada con los tejidos oculares (Lucchesi y Parma, 1999). El daño en la retina en caballos con uveítis está relacionado con la presencia de linfocitos B en la retina (Kalsow y Dwyer, 1998).

2.6. Manifestaciones clínicas

La presentación clínica varía de acuerdo al tropismo del serovar infectante y las condiciones inmunitarias del hospedero. La susceptibilidad a la infección es independiente

de la edad mientras que la severidad es mayor en animales jóvenes (MINSA, 2000). La leptospirosis generalmente produce fiebre y decaimiento en la etapa inicial de la infección. Manifestaciones clínicas como ictericia y hemoglobinuria en los animales jóvenes; meningitis y fallo hepático renal en los perros. Incluso la repentina agalactia en el ganado bovino y ovino puede ser compatible con un cuadro de leptospirosis aguda. Por otro lado, la leptospirosis crónica debe de considerarse en casos de insuficiencia renal crónica, hepatitis crónica activa en perros y uveítis recurrente en equinos (Ellis, 2015).

Por lo general, los animales de abasto no presentan signos clínicos evidentes. Cursan una infección de tipo crónica que puede producir infertilidad, nacimiento de crías débiles, prematuros, momificación fetal, mortinatos y principalmente abortos acompañados de fiebre, debilitamiento y anorexia (Ellis, 2015). La retención placentaria también se puede presentar hasta en el 20% de las vacas que abortan (Ellis *et al.*, 1985a).

Un caso particular es el aborto inducido en el ganado bovino por los serogrupos Grippothyphosa, Pomona y Hardjo. El aborto por el serogrupo Pomona se produce relativamente después de la infección, hallándose títulos altos. Por el contrario, el aborto inducido por el serogrupo Hardjo en el hospedero de mantenimiento (ganado vacuno) es ocasionado por la respuesta inmune variable, hallándose tanto animales seronegativos como con títulos altos (OIE, 2008).

2.6.1. Manifestaciones clínicas en camélidos

Actualmente la biología de la infección por leptospirosis y su papel en la presentación de abortos en los camélidos sudamericanos permanecen desconocidos. Existen reportes como los abortos producidos en un hato de llamas que presentaron títulos elevados contra el serogrupo Grippothyphosa en Norteamérica, cuadros de nefritis intersticial crónica en alpacas de Nueva Zelanda y un brote de abortos en Oregón posiblemente causados por los serogrupos Pomona y Grippotyphosa (Hodgin *et al.*, 1984; Pugh *et al.*, 1995; Lohr y Schaefer, 2009).

2.7. Diagnóstico

La elección e interpretación de las pruebas diagnósticas dependen de la historia clínica del animal o rebaño, el inicio de la infección y el serovar infectante (OIE, 2008). Los exámenes directos se basan en la observación de las leptospiras. Los métodos indirectos, en la demostración de anticuerpos aglutinantes de tipo IgM e IgG (Cerqueira y Picardeau, 2009). Las técnicas moleculares son rápidas, sensibles, específicas y facilitar la identificación de la enfermedad en estadios tempranos. (Rosario *et al.*, 2012)

2.7.1. Toma de muestra

La elección de la prueba diagnóstica depende del intervalo entre el inicio de los signos clínicos y la toma de muestra. En la fase septicémica, la cual dura los primeros 3-10 días, las leptospiras se localizan en la sangre y LCR y su concentración disminuye hacia el día 15. En algunos casos, las leptospiras no pueden ser identificadas en la sangre, probablemente debido a una débil leptospiremia, una toma de muestra retrasada o la administración del antibiótico. A partir de los días 8°-10° pos infección, se inicia la fase inmunológica, la cual se caracteriza por la presencia de anticuerpo específicos (figura 3) (Picardeau, 2013).

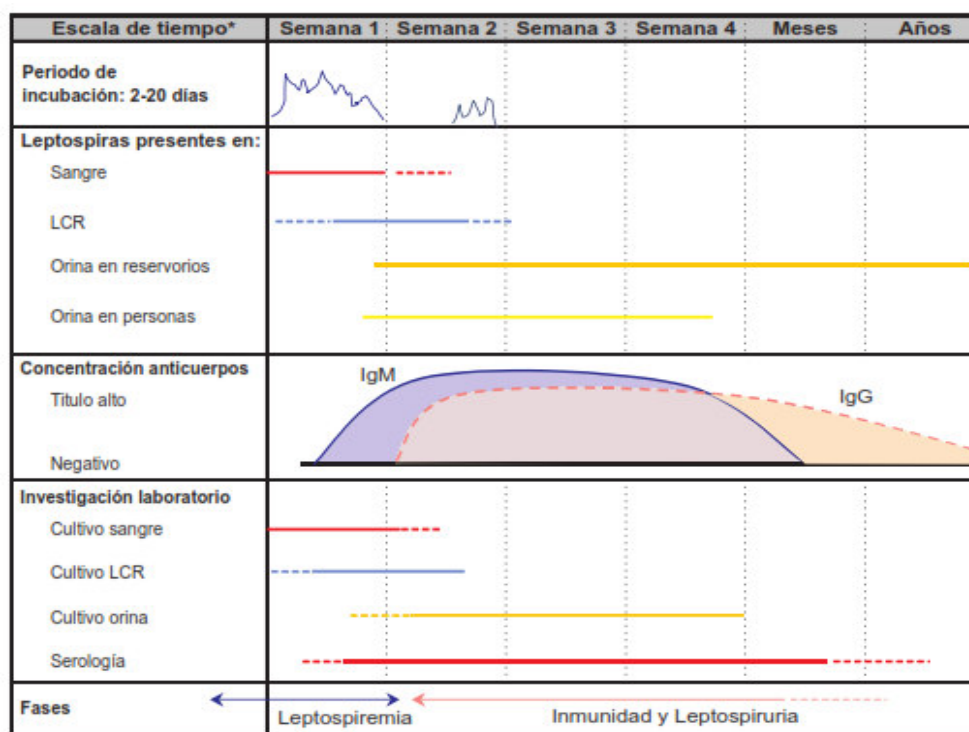


Figura 3. Fases y cinética de la leptospirosis (Céspedes, 2005)

2.7.2. Examen directo

2.7.2.1. Microscopia directa

La microscopía directa incluye la microscopía de campo oscuro, las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas (Levett, 2001). Las muestras deben tomarse durante la fase aguda y como máximo 2 días después de iniciada la antibioterapia (Musso y La Scola, 2013; Picardeau, 2013).

La microscopía de campo oscuro se fundamenta en el tamaño, forma y movimiento de las leptospiras (Levett y Haake, 2009, Picardeau, 2013). Es utilizada como prueba auxiliar por su baja sensibilidad y especificad. Las muestras clínicas de sangre, LCR, orina y tejidos presentan bajas concentraciones de leptospiras y están sujetas a interpretaciones erróneas por la presencia de artefactos como hilos de fibrinas y proteínas que muestran movimiento browniano (Faine *et al.*, 1999; Musso y La Scola, 2013). El umbral de concentración que

debe tener una muestra es de 10^4 leptospiras/ml para una célula por campo (Picardeau, 2013).

Los métodos de tinción aumentan la sensibilidad de la microscopia directa. No obstante, dependen principalmente de la concentración de microorganismos en las muestras. Incluyen tinciones histopatológicas como la tinción plata y la tinción Warthin-Starry, la inmunofluorescencia de orina bovina, la inmunoperoxidasa de sangre y orina y la inmunohistoquímica (Levett, 2001). La tinción plata fue la primera con la que se visualizó las leptospiras y está sujeta a interpretaciones erróneas por la presencia de fibras nerviosas, fragmentos de la membrana celular y filamentos de fibrina (Shieh *et al.*, 2011). En general, estas técnicas no se recomiendan para el diagnóstico de portado crónico ya que la concentración de leptospiras es bajo o localizado (OIE, 2008).

2.7.2.2. Cultivo

El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento bacteriano a partir de muestras clínicas de sangre, LCR u orina. Sin embargo, el cultivo no se considera útil como prueba diagnóstica de rutina debido al prolongado periodo de crecimiento de las leptospiras y su bajo porcentaje de aislamiento (INS, 2002).

La toma de muestras de sangre y LCR se realiza antes de la administración de antibióticos en los primeros 10 días de la enfermedad y la orina a partir de la 2^o-4^o semana (Bal *et al.*, 1994; Céspedes, 2005). La supervivencia de las leptospiras en la orina es limitada por el pH ácido por lo cual el cultivo se realiza dentro de las dos horas. El cultivo también puede realizarse a partir de muestras postmortem de riñón, hígado, cerebro y fetos abortados (Ellis, 2015).

Las muestras se cultivan en el medio ácido oleico-albúmina EMJH y en el agar semisólido de Fletcher. Los cultivos se examinan semanalmente por microscopía de campo oscuro hasta por 16 semanas antes de ser eliminados. No obstante, el tiempo de incubación varía con el serotipo y el número de leptospiras presentes en la muestra. Los cultivos

contaminados pueden ser pasados por un filtro de 0.2- 0.45 μ m antes del subcultivo (Levett, 2001).

2.7.3. Diagnóstico molecular

2.7.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa PCR es una prueba diagnóstica que tiene la capacidad de amplificar de forma exponencial y específica una secuencia determinada de ADN. Se utiliza en los primeros 10 días de la enfermedad a partir de muestras de sangre, orina, LCR y tejidos ante o post mortem (OMS, 2008). El umbral de detección es generalmente de 10-100 leptospiros/ml de sangre u orina (Picardeau, 2013).

La desventaja de la prueba es la limitación para identificar el serovar infectante, necesario para el seguimiento epidemiológico (Céspedes, 2005; Cerqueira y Picardeau, 2009). La prueba puede detectar genes universales presentes en la bacteria como *gyrB*, *rrs* (16S rRNA genes), *secY* y genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira* spp. como *LipL32*, *lfb1*, *LigA* y *ligB2* (Musso y La Scola, 2013; Haake y Levett, 2015). La mejora de la sensibilidad se ha logrado mediante PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR) el cual combina la amplificación y detección del producto amplificado con alta sensibilidad y especificidad y bajo riesgo de contaminación (Espy *et al.*, 2006).

Un resultado negativo no descarta infección subclínica ni la diseminación de leptospiros. Una muestra de orina positiva no se correlacionaría con una enfermedad actual y perros sanos con anticuerpos residuales postvacunales no deberían resultar positivos (Midence *et al.*, 2011).

2.7.4. Examen indirecto

2.7.4.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

La prueba de Microaglutinación (MAT) es considerada la prueba de referencia internacional para el diagnóstico de Leptospirosis humana y animal por su alta sensibilidad y especificidad (Adler y De la Peña Moctezuma, 2010). El MAT también denominado prueba de Martin Pettit fue desarrollado en el Instituto Pasteur en 1918. Se basa en la reacción de aglutinación entre los antígenos vivos de la especie *Leptospira* spp. y los anticuerpos de las muestras de suero en la cual los títulos de aglutinación se evalúan por microscopía de campo oscuro (Levett, 2001).

El MAT es una prueba específica del serogrupo, mas no del serovar. Requiere mantener una colección de antígenos vivos que deben incluir los serovares representativos de cada serogrupo y los serovares endémicos. Un panel incompleto podría ser responsable de falsos negativos (Faine, 1982; Musso y La Scola, 2013). Habitualmente se incluye al serovar Patoc 1 de la especie no patógena *L. biflexa*, la cual tiene por particularidad la reacción cruzada con serovares de serogrupos patógenos (Picardeau, 2013). Por otro lado, la prueba no puede ser estandarizada ya que utiliza antígenos vivos y factores como la edad y densidad del cultivo podrían influenciar en el título de aglutinación (OMS, 2008).

La prueba no discrimina entre una infección anterior y otra reciente. Por lo tanto, requiere comparar resultados de muestras pareadas. Si los signos clínicos están presentes, un intervalo de 3-5 días entre las muestras es adecuado. Mientras que, si el inicio de los signos clínicos no es claro, un intervalo de 10-14 días es apropiado. (Céspedes, 2005; Musso y La Scola, 2013).

La prueba permite identificar seropositivos a partir del día 10°-12° ya que la interpretación de los resultados se dificulta por el alto grado de reacción cruzada entre serovares y serogrupos durante la fase aguda (Faine, 1982). En raras ocasiones, la seroconversión se puede retrasar semanas después de la recuperación. Los anticuerpos que originan las reacciones cruzadas son los primeros en incrementarse y su concentración

disminuye rápidamente. Mientras que los anticuerpos homólogos aparecen tardíamente y persisten por más tiempo, permitiendo la identificación presuntiva del serogrupo responsable de la infección (OMS, 2008). También son comunes las reacciones "paradójicas", donde se observa títulos altos para un serogrupo distinto al infectante (Levett, 2001)

Una muestra se considera seropositiva a un serogrupo si a una dilución dada ($\geq 1/100$) al menos 50% de las leptospiras se hallan aglutinadas en comparación con el antígeno control (Faine, 1982; Picardeau, 2013). La infección aguda es sugerida por un título elevado en presencia de signos clínicos. Su confirmación diagnóstica es señalada en muestras pareadas por el aumento de cuatro veces el título de anticuerpos para uno o más serovares o la seroconversión (Céspedes, 2005; Haake y Levett, 2015). La magnitud del título depende del riesgo de exposición y la seroprevalencia. En áreas de bajo riesgo de exposición, un título bajo ($>1/100$) a uno o más serogrupos en presencia de signos clínicos puede definir un caso probable. Por el contrario, en zonas endémicas se espera un título elevado ($>1/400$), principalmente a cepas locales (Céspedes, 2005; Cerqueira y Picardeau, 2009).

El MAT tiene limitaciones en el diagnóstico de las infecciones crónicas sobre todo en aquellas adaptadas a un hospedero. En estos casos, la concentración de anticuerpos puede descender por debajo del punto de corte, indicando un resultado negativo. Se manifiesta en los casos portadores uro-genitales y de los abortos producidos por el serovar Hardjo en el ganado bovino. (OMS, 2008). Además, se debe considerar que la vacunación extendida contribuye al incremento de seropositivos (OIE, 2008).

La prueba del MAT es la más indicada en estudios de prevalencia. Se aplica a sueros de cualquier especie animal y la gama de los antígenos utilizados se puede ampliar o disminuir según lo requerido. El conocimiento del presunto serogrupo tiene valor epidemiológico en la determinación de la exposición potencial a los reservorios animales. (Levett y Haake, 2009).

2.7.4.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas IgM

La prueba de Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas IgM se basa en la reacción de aglutinación entre antígenos género específicos de *Leptospira* spp. y anticuerpos. La IgM se incrementa rápidamente en la fase aguda y ha sido identificada incluso en la saliva y el LCR (Musso y La Scola, 2013). La prueba es sensible 4-5 días después de la aparición de los signos clínicos, antes de la presentación de IgG (Picardeau, 2013).

La especificidad de la prueba es afectada por las exposiciones previas, el antígeno utilizado y la presencia de otras enfermedades (Bajani *et al.* 2003). En consecuencia, un resultado seropositivo debe ser confirmado por MAT, PCR o cultivo (Picardeau, 2013). El bajo nivel de concordancia entre PCR, MAT y ELISA IgM refleja las fases de la enfermedad lo que sugiere que métodos moleculares y serológicos pueden ser utilizados en diferentes períodos (Ooteman *et al.*, 2006). Varios kits comerciales de ELISA IgM utilizan como antígeno la cepa no patógena *Leptospira biflexa* Patoc la cual comparte varios antígenos de superficie con las cepas patógenas. Otros ELISA IgM contienen un extracto celular de cepas endémicas o de proteínas recombinantes de leptospiros (Picardeau, 2013).

2.8. Inmunidad

2.8.1. Respuesta inmune

Basados en estudios sobre la susceptibilidad de ratones tratados con ciclofosfamida (nocivo para las células B) a infecciones letales por leptospiros, Adler y Faine concluyeron que la respuesta inmune contra las leptospiros es principalmente de tipo humoral y está dirigido contra el serovar infectante y los serovares homólogos (Zuerner, 2015). La especificidad del serovar esta conferida por el LPS una biomolécula glicolípida, altamente antigénica capaz de inducir la producción de anticuerpos aglutinantes (Masuzawa *et al.*, 1996). Sin embargo, investigaciones en el ganado han demostrado que altos títulos de anticuerpos contra LPS no protegen de la infección producida por el serovar Hardjo, serovar más común asociado a leptospirosis crónica bovina Actualmente se acepta que la

principal respuesta inmune en el ganado bovino es la mediada por células (Vinh *et al.*, 1994).

Los anticuerpos aglutinantes tipo IgM predominan en la fase temprana de la leptospirosis aguda y disminuyen durante la segunda semana mientras se incrementa los niveles de anticuerpos IgG. Este último generalmente alcanza concentraciones máximas a partir de la 3^o-4^o semana y se puede mantener durante meses o años. Los animales vacunados o con exposición anterior pueden presentar altos títulos de IgG y bajos de igM. Por el contrario, los títulos de anticuerpos específicos pueden disminuir hasta niveles no medibles en los reservorio (OIE, 2008, OMS, 2008).

2.8.2. Vacunas

La respuesta inmune inducida por la vacunación es tipo humoral en la mayoría de las especies domésticas, exceptuando la inducida en el ganado bovino por el serovar Hardjo (Naiman *et al.*, 2001). Las vacunas de uso veterinario contra la leptospirosis son suspensiones de una o más cepas patógenas de leptospiras inactivadas. Generalmente contienen células completas que se formulan para una especie específica de una determinada región geográfica. El panel adecuado de cepas debe contener aquellos serovares que causen problemas en la especie animal (OIE, 2008). La inmunización puede prevenir la enfermedad causada sólo por serovares homólogos a los presentes en la vacuna pero no siempre impide la evolución al estado de portador crónico renal (OMS, 2008).

La duración de la inmunidad postvacunal varía por especie animal, persistiendo al menos durante 6 meses. Los títulos máximos se pueden mantener hasta por 6 semanas. Sin embargo, la protección es de corta duración, siendo necesaria la revacunación a intervalos regulares (Shieh *et al.*, 2011). La reactividad cruzada paradójica a serogrupos distintos de los vacunales se puede producir, por lo que los títulos a serogrupos no vacunales no implica exposición natural a cepas de campo (Barr *et al.*, 2005). La inmunización de los perros domésticos, los cerdos y el ganado se encuentra más difundida en países desarrollados. En

la mayoría de los países en desarrollo, las vacunas con serovares locales relevantes no están disponibles (Faine *et al.*, 1999).

2.8.2.1. Vacunación en alpacas

Existen pocos estudios sobre la repuesta inmune de la alpaca frente a la vacuna comercial (elaborada para bovinos) y la corta duración de su protección. Actualmente, la vacunación se recomienda sólo en áreas endémicas y excluye a las hembras en gestación (Fowler, 1989).

Un estudio realizado en Nueva Zelanda (1991) en un grupo de 56 alpacas procedentes de Chile exhibió notables variaciones en las respuestas vacunales. Las alpacas fueron vacunadas con 2 ml de vacunas muertas de *Leptospira interrogans* serovares Cophenageni, Pomona y Hardjo. La seropositividad al serovar Cophenageni alcanzó el 80% en la 10ª semana. El 54% de las alpacas respondieron al serovar Hardjo y menos de la mitad (47%) al serovar Pomona (Hill y Wyeth, 1991). Asimismo en Norteamérica, 14 llamas inmunizadas con vacunas pentavalentes (serogrupos: Canicola, Grippothyposa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae y Pomona) para bovinos y porcinos exhibieron respuestas variadas y de corta duración. Las posibles explicaciones para la respuesta se dirigen al uso de vacunas poco inmunogénicas, dosis inadecuada o la deficiente respuesta inmune contra la vacuna administrada (Pugh, 1995).

2.9. Tratamiento

Durante la infección aguda, el tratamiento está dirigido principalmente a la corrección del desequilibrio electrolítico ácido base, la vigilancia de las funciones: renal, hepática y circulatoria y la terapia de soporte. La antibioterapia se inicia ante la sospecha de leptospirosis e incluso antes de las pruebas diagnósticas (Levett y Haake, 2009). Los antibióticos controlan la infección antes de que se produzca daños irreversibles sobre todo en el riñón e hígado (García *et al.*, 2013). No obstante, la eficacia puede disminuir después del día 10 de la enfermedad, al final de la leptospiremia (Shah, 2012).

Las leptospiras son susceptibles a los betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, fluoroquinolonas y estreptomicina. En las infecciones graves se administra penicilina, mientras que, en los casos leves amoxicilina, ampicilina o doxiciclina oral (Miraglia *et al.*, 2013; Chierakul, 2014). Las alternativas para pacientes con hipersensibilidad son amoxicilina oral o azitromicina. (Chierakul, 2014). La penicilina y la doxiciclina son recomendadas para el tratamiento inicial de los humanos y perros con leptospirosis (Sykes, 2013).

En los animales de abasto, la elección de antibióticos varía de acuerdo a la seguridad en la especie, el periodo de descanso, la disponibilidad en el país, el costo y la vía de administración (Cortese *et al.*, 2007). Las tetraciclinas son utilizadas como suplemento alimentario para controlar la leptospirosis clínica porcina, suprimiendo los signos clínicos (Ellis, 2012). La combinación de penicilina y estreptomicina en diluyente de semen es eficaz para matar las leptospiras (Rodríguez *et al.* 2003). La cefalosporina de tercera generación ha demostrado ser útil en el tratamiento de la uveítis recurrente equina (Dixon y Coppack, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

La toma de muestras se realizó en un hato de alpacas de propiedad del IVITA Maranganí ubicado en la Raya, distrito de Maranganí, provincia de Canchis en el departamento de Cusco. El desarrollo de la prueba serológica y el análisis de los resultados se realizó en la Sección Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra necesario para determinar si en la población había individuos infectados se calculó mediante la fórmula de detección de una infección/enfermedad. Se consideró un nivel de confianza del 95%, una población de 200 alpacas y una prevalencia mínima esperada del 1,5%, lo que proporcionó un tamaño muestral de 126 alpacas.

$$n = (1 - (1 - NC)^{1/d}) \cdot (N - \frac{d-1}{2})$$

Donde:

n: Tamaño de muestra requerido

N: tamaño de la población

d: número de individuos enfermos esperados en la población

NC: Nivel de confianza en tanto por uno (p.e. 0.95)

3.2.1. Toma de Muestra

Se obtuvo 126 muestras de sangre de alpacas mayores a un año de edad por muestreo aleatorio simple sin reposición en marzo del 2014. La sujeción del animal en pie se realizó empujando con una mano la cabeza y cuello contra el pecho del operario mientras que con la otra mano se sujetó el hombro de la alpaca ejerciendo presión. Las muestras fueron extraídas por punción de la vena yugular a nivel de las proyecciones ventrales de las apófisis transversas de la sexta vértebra cervical (Fowler, 2010).

Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante cinco minutos para obtener sueros que se almacenaron en microviales estériles dentro de una caja térmica con empaques de gel refrigerante para su conservación durante el traslado al laboratorio, lugar donde fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

3.3. Evaluación serológica de las muestras

3.3.1. Elección de serovares para la Prueba de Microaglutinación

Considerando las recomendaciones de la Guía para el diagnóstico, vigilancia y control de la OMS (2008) se seleccionó 21 serovares de referencia internacional representativos de 21 serogrupos patógenos, entre ellos: Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Hurtsbridge, Icterohaemorrhagiae, Louisiana, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sejroe y Shermani (Apéndice A 2). Los serovares del Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria fueron procedentes de la Unidad de Espiroquetas del Instituto Pasteur de Francia.

3.3.2. Preparación del antígeno

Los serovares se conservaron cultivados en el medio de mantenimiento semisólido Fletcher en que el crecimiento bacteriano se evaluó en relación a la turbidez del halo de crecimiento, también llamado anillo o disco Dinger que se forma varios milímetros debajo

de la superficie. No obstante, la ausencia del halo no excluyó el crecimiento de leptospiras (Faine *et al.*, 1999; OMS, 2008).

En la prueba de Microaglutinación se utilizó serovares cultivados en el medio líquido EMJH ya que las partículas del medio semisólido Fletcher suelen interferir en la interpretación de la prueba. Para preparar los antígenos utilizados en la Prueba de Microaglutinación se extrajo 0.5 ml del medio Fletcher y se sembró en 5ml del medio EMJH a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 a 8 días (OIE, 2008). El crecimiento bacteriano en el medio EMJH, algunas veces, puede notarse a simple vista por la turbidez o la apariencia granular del fondo del tubo (OMS, 2008).

3.3.3. Evaluación del antígeno

El cultivo óptimo alcanzó una concentración aproximada de 10^8 leptospiras/ml y no presentó aglutinaciones de leptospiras. La concentración se evaluó por microscopia, observando un promedio de 150-200 leptospiras/campo. Aquellos cultivos densos se diluyeron con buffer fosfato salino PBS (pH 7,2-7,4) o solución salina fisiológica 0,85%. Los cultivos que alcanzaron concentraciones óptimas se mantuvieron a temperatura ambiente para su uso en la Prueba de Microaglutinación (INS, 2002).

3.3.4. Evaluación serológica o tamizaje

El procedimiento inicial determina la presencia de anticuerpos contra algún serogrupo patógeno de *Leptospira* spp. (INS, 2002).

- En una placa plástica para microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, se depositó 245µl de solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) o PBS en la primera columna, luego se agregó 5µl del suero problema y se homogenizó la solución para obtener una dilución final de 1:50.
- Se extrajo 50µl de la solución anterior y se depositó en forma horizontal en cada una de las siguientes 4 columnas.

- Se agregó 50 µl de solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) a un pocillo para el control del antígeno.
- A cada columna le correspondió un antígeno. Se agregó 50 µl de antígeno en cada pocillo, incluyendo el “pocillo control”. La dilución final del suero fue 1/100.
- Se colocó la microplaca sobre el *shaker* a una velocidad de 500 rpm durante cuatro segundos para homogenizar adecuadamente.
- Se cubrió la microplaca e incubó en una estufa a 28 °C durante dos horas.
- Finalmente se extrajo 2.8µl de cada uno de los pocillos, columna por columna, a un portaobjetos.

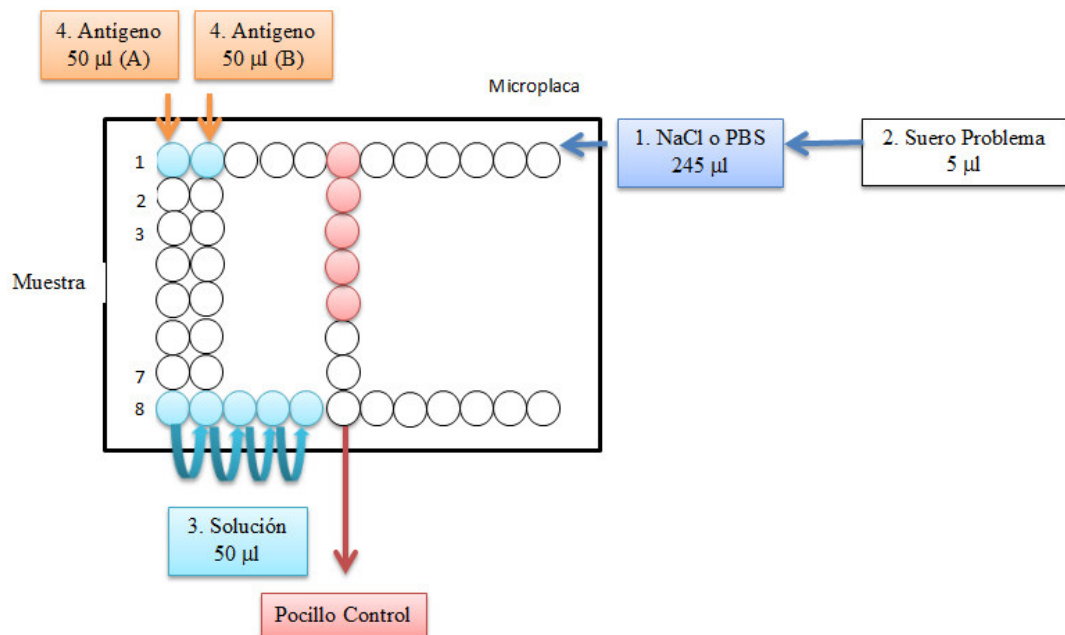


Figura 4. Diagrama del procesamiento del MAT

3.3.5. Evaluación serológica cuantitativa o final

El procedimiento final determina la máxima dilución seropositiva (INS, 2002). Se realiza de la siguiente forma:

- Inicialmente cada fila de la placa de microtitulación fue rotulada con el código de una serovar; y cada columna, con la dilución correspondiente que empieza en 1:50, 1:100; 1:200, 1:400, 1:800, hasta 1:1600.
- Se depositó 245µl de solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) o PBS en la primera columna, luego se agregó 5µl del suero problema y se homogenizó la solución para obtener una dilución final de 1:50.
- A partir de la segunda columna, se depositó 50µl de solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) en forma horizontal hasta la sexta columna y se incluyó un pocillo control.
- Usando una micropipeta multicanal, se mezcló el suero diluido con la segunda columna y luego extrajo 50 µl para verterlo en la tercera columna y así sucesivamente, se continuó con todas las diluciones hasta la sexta columna. Se descartó los últimos 50 µl.
- A cada columna le corresponde un antígeno. Se agregó 50 µl de antígeno en los correspondientes pocillos, incluyendo el “pocillo control”. La dilución final del suero fue de 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600, respectivamente.
- Se colocó la microplaca sobre el shaker a una velocidad 500 rpm durante cuatro segundos para homogenizar adecuadamente.
- Se cubrió la microplaca e incubó en una estufa a 28 °C durante dos horas.
- Finalmente se extrajo 2.8µl de cada uno de los pocillos, columna por columna, a un portaobjetos.

3.3.6. Lectura del MAT

La reacción de aglutinación se visualizó por la formación de grumos más menos densos en los que se observó movimientos de los extremos libres de las leptospiras. El punto de corte o título final utilizado fue el definido por el Subcomité de Taxonomía en *Leptospira* (1984) como la dilución de suero ($\geq 1/100$) que muestre 50% de aglutinación y deje 50% de leptospiras libres en relación al antígeno control. El control es el cultivo diluido en tampón fosfato salino en proporción de 1:2, respectivamente (OIE, 2008; OMS, 2008).

Una muestra se consideró negativa si en una dilución igual y/o mayor a 1:100 no se observa aglutinaciones o si la proporción de leptospiras libres está comprendida entre 50-100% (OMS, 2008). Por el contrario, una muestra con 25-50% de aglutinaciones se consideró como sospechosa y apta a reevaluación (INS, 2002).

Las muestras seropositivas a dos o más serogrupos con títulos semejantes se consideran coaglutinaciones (OMS, 2008).

3.4. Análisis estadístico

Los resultados seropositivos por serogrupos fueron expresados en frecuencias con sus respectivos intervalos de confianza. El cálculo de los intervalos de confianza al 95% se realizó utilizando la simulación en el programa R. En la simulación, se utilizó valores al azar de distribución Beta, empleando para ello las frecuencias observadas por serogrupo. La simulación obtuvo números al azar por 30 000 veces. Los valores de los intervalos de confianza del 95% correspondieron a los valores que representaban el 0.025 y 0.975 de los resultados finales.

Las diferencias entre serogrupos se obtuvieron comparando los intervalos de confianza de cada serogrupo. Se consideró que las frecuencias correspondían a serogrupos diferentes, si, entre dos serogrupos, los intervalos de confianza no se interceptaban en ningún punto.

IV. RESULTADOS

4.1. Seropositividad de las muestras

El 42.85% (54/126) de las alpacas fueron seropositivas a uno o más serovares patógenos de *Leptospira* spp. en la Prueba de Microaglutinación.

4.2. Seropositividad a serogrupos patógenos

Las muestras de sueros fueron seropositivas a 9 serogrupos patógenos: Icterohaemorrhagiae 12.69% (16/126), Pomona 11.11% (14/126), Panama 11.11% (14/126), Hurtsbridge 9.52% (12/126), Ranarum 5.55% (7/126), Ballum 1.58% (2/126), Cynopteri 1.58% (2/126), Djasiman 0.79% (1/126) y Hebdomadis 0.79% (1/126).

No se observó serorreacción contra los otros 12 serogrupos patógenos utilizados en la Prueba de Microaglutinación (Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Grippytyphosa, Louisiana, Manhao, Mini, Pyrogenes, Sejroe y Shermani). La frecuencia de estos 12 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp se halló por debajo de la prevalencia mínima esperada del 1.5%.

Cuadro 1. Frecuencia de serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. en alpacas (n=126)

Serogrupos	Positivo	Frecuencia %	IC _(0.95) %
Icterohaemorrhagiae	16	12.69	7.97 - 19.62
Pomona	14	11.11	6.77 - 17.81
Panama	14	11.11	6.77 - 17.81
Hurtsbridge	12	9.52	4.21 - 12.23
Ranarum	7	5.55	2.76 - 11.03
Ballum	2	1.58	0.48 - 5.54
Cynopteri	2	1.58	0.48 - 5.54
Djasiman	1	0.79	0.19 - 4.30
Hebdomadis	1	0.79	0.19 - 4.30

4.3. Títulos de aglutinación a serogrupos patógenos

Se determinó el título de aglutinación de cada muestra seropositiva a un serogrupo patógeno de *Leptospira* spp., los títulos bajos fueron los de mayor frecuencia, mientras que un reducido número de muestras presentaron títulos altos.

Cuadro 2. Títulos de anticuerpos contra serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. de las alpacas seropositivas (n=54)

Serogrupos	Títulos				
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
Ballum	2	-	-	-	-
Cynopteri	2	-	-	-	-
Djasiman	1	-	-	-	-
Hebdomadis	1	-	-	-	-
Hurtsbridge	1	5	1	3	2
Icterohaemorrhagiae	12	4	-	-	-
Panama	2	9	3	-	-
Pomona	1	10	2	-	1
Ranarum	3	3	1	-	-

4.4. Coaglutinaciones

Se halló 3 muestras seropositivas 2.38% (3/126) que presentaron coaglutinaciones a serogrupos patógenos en la prueba de Microaglutinación.

Cuadro 3. Serogrupos y título de anticuerpos coaglutinantes

Serogrupos	Títulos				
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
Panama-Pomona-Hurtsbridge	-	1	-	-	-
Pomona-Hurtsbridge	-	1	-	-	-
Icterohaemorrhagiae-Panama	-	1	-	-	-

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la seropositividad a los serovares de referencia de 21 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. en muestras sanguíneas de alpacas mediante prueba de Microaglutinación (MAT). Se obtuvo un porcentaje de seropositividad de 42.85% (34.51-51.70%) a uno o más serovares patógenos. La frecuencia obtenida presentó diferencia estadísticamente significativa al 6.5% (5.05-8.47%) registrado por Herrera *et al.*, (2002) en el departamento de Puno y al 89.6%, (87.33-91.58%) de Rosadio *et al.*, (2012) en las comunidades de Ayacucho y Huancavelica. Por el contrario, no se observó diferencia a la frecuencia del 44.8% (39.61-50.04%) reportada por Santos *et al.*, (2009) en el INIA de Quimsachata-Puno (Apéndice A 3).

El análisis de los intervalos de confianza indicó diferencia estadística significativa al comparar las frecuencias del serogrupo Icterohaemorrhagiae, Pomona y Panama y los serogrupos Ballum, Cynopteri, Hebdomadis y Djasiman. Los mayores frecuencias de seropositivos corresponden a los serogrupos Pomona 11.11% (6.77-17.81%) e Icterohaemorrhagiae 12.69% (7.97-19.62%) con títulos máximos de 1/600 y 1/1200, respectivamente. Las frecuencias de los serogrupos Pomona e Icterohaemorrhagiae presentaron diferencia estadística significativa a las reportadas hace más de una década por Rosario *et al* (2012) en los departamentos de Huancavelica y Ayacucho (Pomona 37.8% 34.49-41.25% e Icterohaemorrhagiae 43.4% 39.90-46.81%) y a las registradas por Herrera *et al.*, (2000): Pomona 5.18% /3.85-6.94%) e Icterohaemorrhagiae 0.25% (0.07-0.88%).

Cabe resaltar que los serogrupos Pomona e Icterohaemorrhagiae han sido los serogrupos de mayor frecuencia en los estudios de prevalencia realizados en las alpacas y otras especies de camélidos sudamericanos (Rosario *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2009; Rosario *et al.*, 2012).

La mayor parte de los títulos fueron bajos y estuvieron comprendidos entre 1/100 y 1/200. El bajo porcentaje de títulos altos en las alpacas evaluadas indicarían una infección reciente o una enfermedad aguda si se presentasen signos clínicos. Títulos bajos podrían estar asociados a exposiciones anteriores o al historial de una infección teniendo en cuenta en el análisis de los resultados que las alpacas son animales de producción que no cuentan con un calendario de vacunación contra la leptospirosis. Considerando que generalmente un hospedero de mantenimiento puede ser seronegativo a la Prueba de Microaglutinación como es el caso del ganado bovino infectado por el serovar Hardjo, un resultado negativo o un título por debajo del punto de corte establecido (1/100) en la prueba de Microaglutinación, no excluiría una infección crónica en las alpacas, ni el diagnóstico de aborto o la posibilidad de ser identificado como un hospedero de mantenimiento (Radostis, 2002; OIE, 2008).

Pese a que las condiciones medioambientales de las zonas altoandinas son adversas para la supervivencia de las leptospiras, la infección de las alpacas por el serogrupo Pomona estaría asociada al pastoreo mixto de diferentes especies domésticas bovina, ovina y camélidos sudamericanos para aprovechar los pastos naturales y cultivados (Herrera *et al.*, 2000 y Rosadio *et al.*, 2003). El serogrupo Pomona tiene como hospedero de mantenimiento a los cerdos. Se caracteriza por producir infecciones esporádicas en el ganado bovino y equino ocasionando fallas reproductivas, infertilidad, abortos, mortalidad perinatal, nacimiento de crías débiles y disminución de la producción láctea (Grooms y Bolin, 2005; Ellis, 2015). En los camélidos, las leptospiras han sido consideradas como causa de abortos a pesar de que existen pocos reportes relevantes sobre el rol de estos organismos en la presentación de abortos en estas especies (Pearson *et al.*, 2014). Entre los principales agentes abortivos infecciosos se describen el virus de la Diarrea viral bovina (BVDV-1b), bacterias como *Leptospira* spp., *Brucella mellitensis*, *Listeria*

monocytogenes, *Campylobacter fetus* y los protozoarios: *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. (Pearson *et al.*, 2014).

En los camélidos sudamericanos, el serogrupo Icterohaemorrhagiae no ha sido vinculado a algún cuadro clínico específico. En los humanos y perros ocasiona graves cuadros clínicos ictero-hemorrágicos, insuficiencia hepática-renal e incluso la muerte (Céspedes, 2005). Entre los años 1994-2004, Céspedes *et al.* (2006) reportaron la presencia del serogrupo Icterohaemorrhagiae en 15 departamentos del Perú, incluyendo los departamentos de Cusco y Huancavelica, donde han sido reportados camélidos sudamericanos seropositivos al serogrupo Icterohaemorrhagiae por la prueba de Microaglutinación. La diseminación de este serogrupo en la mayor parte del territorio nacional es multifactorial y estaría favorecida además por el nicho ecológico y la bacteriuria continúa de su principal reservorio: los roedores domésticos y sinantrópicos (Liceras de Hidalgo *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 2000)

El presente estudio señala que existen anticuerpos contra los serogrupos patógenos: Ballum, Djasiman, Hurtbridge, Panama y Ranarum en las alpacas del IVITA Maranganí; Estos serogrupos no habían sido reportados en alpacas, posiblemente debido al panel incompleto de serogrupos patógenos (25 serogrupos establecidos) evaluados en los anteriores estudios, lo cual disminuyó la sensibilidad del MAT. Los serogrupos Ballum y Djasiman han sido identificados en casos humanos de 13 departamentos del Perú, mientras que el serogrupo Panama solo en los departamentos de Ayacucho y Loreto (Céspedes *et al.*, 2006). Desde el punto de vista de la salud pública, la seropositividad a los distintos serogrupos patógenos sugiere que estos serovares estarían circulando en la zona en estudio y que la alpaca podría actuar como un hospedero con capacidad de diseminar las leptospirosis a través de la orina, convirtiéndose en un potencial riesgo zoonótico para los pobladores de la región.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica. Afecta el desarrollo de los sistemas de producción de animales, ocasionando principalmente abortos y disminución de la producción láctea (García *et al.*, 2013). En las zonas altoandinas donde viven alrededor de

3.6 millones de alpacas, su producción y crianza constituye una de las actividades económicas más difundida de la cual dependen alrededor de 150 000 familias en su mayoría comunidades campesinas (INEI, 2012). El comercio de la fibra y carne de alpaca representarían el 70-80% del ingreso familiar anual (Ramírez, 1991; FAO, 2008).

VI. CONCLUSIONES

- Las alpacas del IVITA Maranganí fueron seropositivas contra nueve serogrupos patógenos: Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hurtsbridge, Panama, Ranarum, Ballum, Cynopteri, Djasiman y Hebdomadis.
- Las alpacas del IVITA Maranganí fueron seropositivas contra los serogrupos patógenos Ballum, Djasiman, Hurtbridge, Panama y Ranarum, serogrupos que no habían sido reportados en alpacas anteriormente.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Acha, P, Szyfres B. 1986.** Leptospirosis. En Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. OPS. 2º ed. 112-120.
2. **Acosta H, Moreno C, Viáfara D. 1994.** Leptospirosis: revisión del tema. Colombia médica 25: 36-42.
3. **Adler B, De la Peña M. 2010.** Leptospira. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, eds. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4ºed. Wiley Blackwell. p 527-547.
4. **Adler B. 2015.** History of Leptospirosis and *Leptospira*. En Adler B, ed. Leptospira and Leptospirosis. 387: p 1-9.
5. **Alston JM and Broom JC. 1958.** Leptospirosis in man and animals. E and S. Livingstone, Edinburgh, U.K.
6. **Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. 2003.** Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol. 41: 803-809.
7. **Bal, AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, Meza-Brewster J, Korver H and Terpstra WJ. 1994.** Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol. 32: 1894-1898.

8. **Barr SC, Mcdonough PL, Scipioni-Ball RL et al. 2005.** Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirscheneri* serovar grippotyphosa. *Am J Vet Res* 66: 1780-1784
9. **Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA. 2003.** Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 3: 757-71.
10. **Brendle JJ, Rogul M, Alexander AD. 1974.** Deoxyribonucleic acid hybridization among selected leptospiral serotypes. *Int J Syst Bacteriol.* 24:205-214.
11. **Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. 1999.** Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 839-858.
12. **Brihuega B, Leoni L, Martínez M. 1996.** Leptospirosis en llamas (*Lama glama*): Estudio serológico. *Rev Arg Prod Anim.* 16: 393-396.
13. **Cameron C. 2015.** Leptospiral structure, physiology and metabolism. En Adler B, ed. *Leptospira and Leptospirosis.* 387: p 21-41.
14. **Cerqueira G, Picardeau M. 2009.** A century of *Leptospira* strain typing. *Infection Genetics and Evolution.* 9: 760-768.
15. **Céspedes ZM. 2005.** Leptospirosis: Enfermedad zoonótica reemergente. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 22(4): 290-307.
16. **Céspedes ZM, Balda L, Gonzalez D, Tapia R. 2006.** Situación de la Leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 23(1): 56-66 p.
17. **Chierakul W. 2014.** Leptospirosis. En: Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloa D, White N, eds. *Manson's Tropical diseases.* 23° ed. China: Elsevier Saunder. p 433-440.
18. **Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. 2002.** *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. *Microb Pathog* 33: 299-305.
19. **Cortese V, Behan S, Galvin J, Penka D, Ramsey D, Bryson W, Lucas M. 2007.** Evaluation of two antimicrobial therapies in the treatment of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo infection in experimentally infected cattle. *Vet Therap* 8: 201-208.

20. **Dixon P, Coppack R. 2002.** Equine recurrent uveitis. *Vet Rec.* 150:556.
21. **Ellinghausen HC and McCullough WG. 1965.** Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res.* 26: 45-51.
22. **Ellis WA, Hovind-Hougen K, Moller S et al. 1983.** Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 255: 323-335.
23. **Ellis WA, O'Brien JJ, Bryson DG, Mackie DP. 1985a.** Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar Hardjo infection. *Vet Rec* 117: 101-104.
24. **Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA, Neill SD, Hanna J. 1985b.** Excretion of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo following calving or abortion. *Res Vet Sci.* 39(3): 296-98.
25. **Ellis WA. 2012.** Leptospirosis. En: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Swartz KJ, Stevenson GW, eds. *Diseases of swine.* Wiley, New York. p770-778.
26. **Ellis WA. 2015.** Animal leptospirosis. En Adler B, ed. *Leptospira and Leptospirosis.* 387: p 98-137.
27. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. 2006.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 19: 165-256.
28. **Evangelista KV, Coburn J. 2010.** *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5(9): 1413-1425.
29. **Everard JD and Everard COR. 1993.** Leptospirosis in the Caribbean. *Rev Med Microbiol.* 4: 114-122.
30. **[FAO]. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación. 2008.** Análisis de impacto de los eventos de fríos del 2008 en la agricultura y ganadería altoandina en el Perú. [Internet], [18 diciembre 2016]. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/emergencias/docs/1_Peru_ESTUDIO_FINAL_FRIAJE_OCT_13_2008.pdf

31. **Faine S. 1982.** Guidelines for the Control of Leptospirosis. Geneva, World Health Organization. WHO Offset Publication No 67
32. **Faine S, Adler B, Bolin C et al. 1999.** Leptospira and leptospirosis. 2°ed. Melbourne: Med Sci.
33. **Fowler ME. 2010.** Medicine and surgery of camelids. 3°ed. Singapore: Wiley Blackwell. 630p.
34. **García GR, Reyes TA, Basilio HD, Ramírez PM, Beatriz Rivas S. 2013.** Leptospirosis: Un problema de salud pública. Rev Latinoamer Patol Clin. 60(1): 57-70.
35. **Gonzalez RA, Batista SN, Valdés AY, Gonzalez GM. 2002.** Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar Mozdok en medio EMJH modificado. REV Cubana Med Trop. 54(1): 32-6.
36. **Groom DL, Bolin CA. 2005.** Diagnosis of fetal loss caused by Bovine Viral Diarrhea Virus and *Leptospira* spp. Vet Clin Food Anim. 21: 463–472
37. **Haake DA, Levett PN. 2015** Leptospirosis in Human. En Adler B, ed. Leptospira and Leptospirosis. 387: p 64-97.
38. **Hartskeerl RA, Terpstra WJ. 1996.** Leptospirosis in wild animals. Vet Q. 18(3): 149-50.
39. **Hellstrom, JS, Marshall R.B. 1978.** Survival of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in an acidic soil under simulated New-Zealand field conditions. Research in Veterinary Science. 25(1): 29-33.
40. **Herrera J, Vasconcellos S, Morais Z, Ferreira F, Sakamoto S, Ferreira J, Pinheiro S. 2000.** Soropositividade para leptospirose em alpacas criadas no altiplano peruano. Puno, Peru. Análise de associação com o índice pluviométrico. Arq Inst Biol. 67(2): 171-176.
41. **Hill FI, Wyeth TK. 1991.** Serological reactions against *Leptospira interrogans* serovars in alpacas after vaccination. N Z Vet. J. 39: 32-33.
42. **Hodgin C, Schillhorn van Veen T, Fayer R, Ritcher N, 1984.** Leptospirosis and coccidia in a guanaco. J Am Vet Med Assoc. 185: 1442-1444.

43. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** IV Censo nacional agropecuario 2012 IV CENAGRO. [internet], [10 de diciembre 2016]. Disponible en:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2010/Reports/Reports_4/PER_SPA_PRE_REP_2012.pdf
44. **[INS]. Instituto Nacional de Salud. 2002.** Manual de procedimientos bacteriológicos y serológicos para el diagnóstico de la leptospirosis. Perú. INS. Serie de normas técnicas. 53 p.
45. **Johnson RC, Rogers FC. 1964a.** Differentiation of pathogenic and saprophytic *Leptospirae* with 8-azaguanine. J Bacteriol. 88: 1618-1623.
46. **Johnson RC, Rogers P. 1964b.** 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of *leptospirae*. J Bacteriol. 87: 422-426.
47. **Kalsow CM, Dwyer AE. 1998.** Retinal immunopathology in horses with uveitis. Ocul Immunol In amm. 6: 239-251.
48. **Kmety E, Dikken H. 1993.** Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovares. University Press Groningen.
49. **Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009.** *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 7: 736-747.
50. **Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. 2001.** Bacterial plasminogen activators and receptors. FEMS Microbiol Rev. 25:531-552.
51. **Levett PN. 2001.** Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. 14(2): 296-326.
52. **Levett PN, Haake DA. 2009.** *Leptospira* Species (leptospirosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 7° ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. p 241-247.
53. **Levett PN. 2015.** Systematics of Leptospiraceae. En Adler B, ed. *Leptospira* and Leptospirosis. 387: p10-20.
54. **Liceras de Hidalgo J, Valdivia Paz SS, Higuchi E. 1989.** Leptospirosis en Perú. Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Lima: Ministerio de Salud/OPS/Concytec. p 7-20.

55. **Lin YP, Lee DW, McDonough SP, Nicholson LK, Sharma Y, Chang YF. 2009.** Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. *J Biol Chem* 284: 19380-19391.
56. **Llorente P, Leoni L, Martinez-Vivot M. 2002.** Leptospirosis en camélidos sudamericanos. Estudio de prevalencia serológica en distintas regiones de la Argentina. *Arch Med Vet.* XXXIV(1): 59-68.
57. **Lohr CV, Schaefer DL. 2009.** Abortion in llamas and alpacas: a 5 year retrospective study. In: *Proceedings of the International Camelid Health Conference.* Corvallis: OR. p 115.
58. **Lucchesi PM y Parma AE. 1999.** A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71: 173-179.
59. **Malajov Y, Panin A, Sovoliov G. 2007.** Leptospirosis de los animales. 3ºed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas Cuba. 24-53p.
60. **Masuzawa T, Nakamura R, Beppu Y, Yanagihara Y, 1996.** Immunochemical characteristics and localization on cells of protective antigen (PAG) prepared from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Microbiology and Immunology.* 40: 237-241.
61. **Mesa JB. 2010.** Patología relacionada con el tracto reproductivo en herbívoros, carnívoros y primates. En *Mem Conf Interna Med Aprovech Fauna Silv Exot Conv.* Asociación de veterinarios de vida silvestres.
62. **Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM. 2011.** Effect of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *J Vet Intern Med.* 26: 149-152.
63. **[MINSA] Ministerio de Salud. 2000.** Leptospirosis: módulos técnicos. Lima: MINSA. Serie de documentos monográficos N°2. 56 p.
64. **Miraglia F, Matsuo M, Morais MZ, Dellagostin OA, Kömmling SF, Freitas JC, Hartskeerl R, Zanolli ML, Costa BL, Oliveira SG, Arruda VS, Micke MA. 2013.** Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77: 195-199.

65. **Mori Y, Notomi T. 2009.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 15: 62-9.
66. **[MSAL] Ministerio de Salud de la Nación. 2014.** Enfermedades infecciosas: leptospirosis. Buenos Aires. Guía para el equipo de salud N°9. 48 p.
67. **Murray GL. 2013.** The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol.* 162: 305-314.
68. **Musso D, La Scola B. 2013.** Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 46: 245-252.
69. **Naiman BM, Alt D, Bolin CA. 2001.** Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. *Infect Immun.* 69: 7550-7558.
70. **Narayanavari SA, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. 2012.** Multiple leptospiral sphingomyelinases. *Microbiol* 158: 1137-1146.
71. **Nascimento LTO, Ko AI, Martins AEL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA. 2004.** Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveal novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol.* 186: 2164-2172.
72. **[OIE]. Organización mundial de la Sanidad Animal. 2008.** Manual de las pruebas diagnósticas y de vacunas para los animales terrestres. [Internet]. [15 diciembre 2016]. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf
73. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2008.** Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Serie de manuales técnicos N° 12. [Internet]. [15 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>
74. **Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. 2006.** Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods.* 65:247-257.
75. **Ortega LM, Risco V, Arnaiz I, García-Peña F, Rosadio R, Castillo H, Wheeler J, Hoces D. 2009.** Evaluación del impacto sanitario de los nuevos sistemas de manejo

- en la población de vicuña del Perú. En: López D, Vendrell E, eds. Investigación en agricultura para el desarrollo. Barcelona: Red de Investigación en Agricultura para el Desarrollo. p 182-187.
76. **Palaniappan R, Ramanujam S, Chang Y. 2007.** Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 20(3): 284-292.
 77. **Pearson LK, Rodriguez JS, Tibary A. 2014.** Disorders and diseases of pregnancy. En: Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW, eds. Llama and alpaca care: medicine, surgery, reproduction, nutrition and herd health. 1° ed. Canada: Saunder Elsevier. p 256- 273.
 78. **Picardeau M, Bulach D, Bouchier C, et al. 2008.** Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One.* 3(2): 1607.
 79. **Picardeau M. 2013.** Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses.* 43: 1-9.
 80. **Pugh DG, Wright J, Rowe S. 1995.** Serologic response of llamas to a commercially prepared leptospirosis vaccine. *Small Ruminant Research.* 17: 193-196
 81. **Radostits M, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2002.** Medicina Veterinaria: Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9° ed. España: McGraw Hill Interamericana. 1151-1168 p.
 82. **Ramirez A. 1991.** Enfermedades infecciosas en alpacas y llamas. En: Novoa CS, Florez A, eds. Producción de rumiantes menores: alpacas. Lima: INIA Resúmenes. p.201-247.
 83. **Ratnam, S. 1994.** Leptospirosis: an Indian perspective. *Indian J Med Microbiol* 12: 228-239.
 84. **Ricaldi, JN, Vinetz JM, 2006.** Leptospirosis in the tropics and in travelers. *Curr Infect Dis Rep.* 8: 51-58.
 85. **Rodrigues ALB, Girio RJS, Esper CR, Rodrigues LH, Magajevski FS, Oliveira MA. 2003.** *Leptospira interrogans* serovar Pomona bovine semen survive contaminated experimentally. *Revista Brasileira de Reproducao Animal* 27: 636-643.

86. **Rosadio R, Rivera H, Chávez A, Serrano E, Quispe R, Rodríguez J, Yaya K. 2003.** Seroprevalencia de agentes abortigénicos en alpacas de la provincia de Canchis, (Cuzco, Perú). En: III Congreso Mundial de Camélidos. Oruro, Bolivia. p 863-868.
87. **Rosadio R, Véliz A, Castillo H, Yaya K, Rodríguez A, Rivera H, Wheeler J. 2012.** Seroprevalencia a serovares de *Leptospiras* patógenas en alpacas y vicuñas de los departamentos de Huancavelica y Ayacucho. Perú Rev Inv Vet. Perú 23(3): 350-356.
88. **Rosario LA, Arencibia DF, Batista N, Jirón W, Valdés BY, Suárez YE, Infante JF. 2012.** Leptospirosis, una revisión actualizada. Vet Arg. 29(291): 1-53.
89. **Santos Y. 2006.** Seroprevalencia de leptospirosis en alpacas de la localidad de Quimsachata-Puno en época de lluvias. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 66 p.
90. **Shah Ira. 2012.** Leptospirosis. Pediatric Infectious Disease. 4(1): 4-8.
91. **Shieh WJ, Edwards Ch, Levett PN, Zaki SR. 2011.** En: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds. Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice. 3°ed. China: Elsevier Saunder. p 303-307.
92. **Silva E, Santo C, AThanazio D, Seyffert N, Seixas F, Cerqueira GM et al. 2008.** Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in hamster model. Vaccine 26: 3892-3
93. **Smibert RM. 1977.** The Spirochaetales. In Laskin AI and Lechavelier HA, eds. CRC. Handbook of microbiology. 2°ed. Cleveland, Ohio: CRC Press. 1: p195-228.
94. **Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E et al. 2007.** *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. PLoS ONE. 2(11): 1188-1195.
95. **Sykes JE. 2013.** Leptospirosis En Sykes, ed. Canine and feline infectious diseases. Elsevier. p 474-486.
96. **International committee on systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of Leptospira. 1984.** Minutes of the meeting, 6 to 10 August 1982, Boston, Massachusetts, USA. International Journal of Systematic Bacteriology 34: 258-259.

97. **Vinh T, Adler B and. Faine S. 1982.** The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: in vitro and in vivo studies. *Pathology* 14: 463-468.
98. **Vinh T, Faine S, Handley CJ, Adler B. 1994.** Immunochemical studies of opsonic epitopes of the lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 8: 99-108.
99. **Waitkins SA. 1986.** Leptospirosis as an occupational disease. *Br J Ind Med.* 43: 721-725.
100. **Wolbach SB, Binger CAL. 1914.** Notes on a filterable spirochete from fresh water. *Spirocheta biflexa* (new species). *J Med Res.* 30:23-25.
101. **Zuerner RL. 1991.** Physical map of the chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res.* 19: 4857-4860.
102. **Zuerner RI. 2015.** Host response to *Leptospira* infection. En Adler B, ed. *Leptospira and Leptospirosis.* 387: p 222-250.

VIII. APÉNDICE

CUADRO A 1. Especies del genero *Leptospira* descritas actualmente.

Especies	Serogrupos	Serovar	Cepa
Patógenas			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao	3 L 60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermedias			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	ND	ND	5399
Saprófitas			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo	Sao Paulo

ND: No determinado

CUADRO A 2. Serovares de *Leptospira* spp, utilizados en la prueba de Microaglutinación (MAT)

Nº	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
4	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
6	<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
7	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
8	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
9	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
10	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
11	<i>L. fainei</i>	Hurtsbridge	Hurtsbridge	BUT6
12	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
13	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945
14	<i>L. interrogans</i>	Manhao	Lincang	L14
15	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
16	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
17	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
18	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
19	<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
20	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee
21	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K

CUADRO A 3. Antecedentes de seroprevalencia de *Leptospira* spp. en alpacas del Perú

Estudio	Herrera <i>et al.</i> , 2000	Santos <i>et al.</i> , 2009	Rosadio <i>et al.</i> , 2012
Lugar	Altiplano-Puno	Quimsachata-Puno	Ayacucho y Arequipa
Tamaño muestral	810	344	793
Frecuencia %	6.5 (5.05-8.47)	44.8 (39.61-50.04)	89.6 (87.33-91.58)
Pomona %	5.18 (3.85-6.94)	43.6 (38.48-48.86)	37.8 (34.49-41.25)
Icterohaemorrhagiae	0.25 (0.07-0.88)	9.9 (7.18-13.54)	43.4 (39.90-46.81)